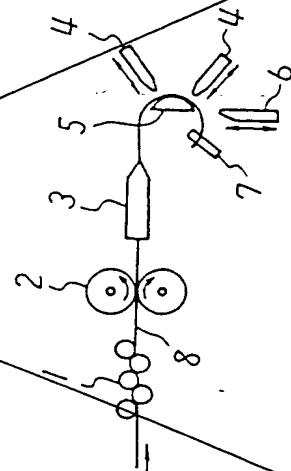


(54) PRODUCTION OF STEEL WIRE FOR SPRING EXCELLENT IN AUTOMATICALLY CONTROLLED FORMABILITY

(11) 3-291400 (A) (43) 20.12.1991 (19) JP
 (21) Appl. No. 2-90170 (22) 6.4.1990
 (71) NIPPON STEEL CORP (72) HIROSHI OBA(1)
 (51) Int. Cl^s. C25F1/06//B21C43/04

PURPOSE: To easily produce a steel wire for spring excellent in automatically controlled formability by wiredrawing a wire rod to the final wire diameter and then carrying out electrolytic degreasing at a specific current density at the time of producing a wire for spring made of steel.

CONSTITUTION: At the time of forming a steel wire 8 for spring by using a spring forming mechanism consisting of straightener rollers 1, feed rollers 2, a wire guide 3, milling pins 4, a mandrel 5, a cutting tool 6, and a pitch tool 7, a steel wire prepared by wiredrawing a steel wire rod as starting material to the final wire diameter as a spring product and then carrying out electrolytic degreasing treatment at 3-10A/dm² current density for 10-180sec by immersion in an NaOH-containing electrolytic bath is used. By this method, a coil spring excellent in dimensional accuracy as well as in the automatic controllability of the height of coil can be stably produced at the time of producing the coil spring.



(54) POLYSACCHARIDE-STEROL DERIVATIVE AND ITS PRODUCTION

(11) 3-292301 (A) (43) 24.12.1991 (19) JP
 (21) Appl. No. 2-94130 (22) 11.4.1990
 (71) NIPPON OIL & FATS CO LTD(1) (72) JUNZO SUNAMOTO(2)
 (51) Int. Cl^s. C08B35/02,C08B37/00,C08B37/14//A61K9/107,A61K9/127

PURPOSE: To produce a polysaccharide-sterol derivative having a predetermined amount of sterol groups readily introduced thereto without introducing the carboxyl groups of a polysaccharide by reacting a compound having a sterol group on one end and an isocyanate group on the other with the polysaccharide.

CONSTITUTION: A sterol (e.g. cholesterol) is reacted with a diisocyanate compound (e.g. hexamethylene diisocyanate) to produce a compound having sterol group on one end and an isocyanate group on the other. This compound is reacted with a polysaccharide (e.g. pullulan or amylopectin) to obtain a polysaccharide-sterol derivative in which 0.1-6 saccharide units per 100 saccharide units constituting the polysaccharide are substituted by groups of the formula (wherein R¹ is a 1-10C hydrocarbon group which may be substituted by an aromatic group; and R² is a sterol residue). This derivative can be desirably used as a coating material for liposomes as a carrier for medicines.



(54) NEW PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE HS-142-1 AND ITS PRODUCTION

(11) 3-292302 (A) (43) 24.12.1991 (19) JP
 (21) Appl. No. 2-94295 (22) 10.4.1990
 (71) KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD (72) YOSHIKAZU MORISHITA(9)
 (51) Int. Cl^s. C08B37/00,S07H13/06,C12P19/04//A61K31/70(C12P19/04,C12R1/645)

PURPOSE: To obtain advantageously a new physiologically active substance HS-142-1 having an antagonistic action against an ANP receptor by cultivating a microorganism of the genus *Aureobasidium* having an ability to produce HS-142-1 and collecting the substance from the culture.

CONSTITUTION: A microorganism belonging to the genus *Aureobasidium* and having an ability to produce HS-142-1 (e.g. *Aureobasidium* · *pullulans* · var. *melanigenum* KAC-2383, FERM-P 2407) is cultivated in a medium to produce HS-142-1 in this medium, and the HS-142-1 is collected from the culture. This HS-142-1 is a new physiologically active substance having a structure in which the hydroxyl group in any desired position of D-glucose of a linearly $\beta 1 \rightarrow 6$ bonded D-glucose oligomer is esterified with the carboxyl group of caproic acid.

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

平3-292301

⑬ Int. Cl.

C 08 B 35/02
37/00
37/14
// A 61 K 9/107
9/127

識別記号

D
D
B
D

厅内整理番号

7624-4C
7624-4C
7624-4C
7624-4C
7624-4C

⑭ 公開 平成3年(1991)12月24日

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全8頁)

⑮ 発明の名称 多糖類-ステロール誘導体とその製造法

⑯ 特願 平2-94130

⑰ 出願 平2(1990)4月11日

⑱ 発明者 砂本 順三 滋賀県草津市若草2-14-1
⑲ 発明者 秋吉 一成 京都府宇治市五ヶ庄(番地なし) 京都大学職員宿舎641
号
⑳ 発明者 山口 茂彦 京都府京都市伏見区深草西浦町8-102 メゾンドバビヨ
ン0312
㉑ 出願人 日本油脂株式会社 東京都千代田区有楽町1丁目10番1号
㉒ 出願人 砂本 順三 滋賀県草津市若草2-14-1
㉓ 代理人 弁理士 舟橋 栄子

明細書

1. 発明の名称

多糖類-ステロール誘導体とその製造法

2. 特許請求の範囲

(1) 多糖類を構成する糖単位100個当たり、

0.1~6個の糖単位の水酸基が一般式:



(但し、R¹は炭素数1~10の炭化水素基、あるいは芳香族基で置換された1~10の炭化水素基、R²はステロールの残基を示す)で表される基で置換された多糖類-ステロール誘導体。

(2) 多糖類がアルラン、キシログルカン、アミロベクチン及びマンナンから選ばれる請求項1記載の多糖類-ステロール誘導体。

(3) 請求項1記載の多糖類-ステロール誘導体を合成するに際し、分子の一端にステリル基と他端にイソシアナト基を有する化合物を用い、多糖類と反応させることを特徴とする多糖類-ステロール誘導体の製造法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、多糖類-ステロール誘導体、およびその製造法に関する。

(従来の技術)

多糖類-コレステロール誘導体は、リポソームの多糖被覆剤(特開昭61-69801号)、脂肪乳剤の被覆剤(特開昭63-319046号)、多糖被覆エマルション作成時の高分子界面活性剤(特願昭63-296018号)として既に利用されており、その合成方法の一つとして特開昭61-69801号の方法が公知となっている。

近年、薬物の運搬体としてリポソーム、D/W型エマルションが有望とされているが、これらを多糖被覆することにより生体内外での化学的・物理的安定性を向上させるのみならず、さらに、特定の細胞群に対する標的指向性も発揮されることが報告されている(アンダース・カールソン、佐藤智典、砂本順三、ブレテン・ケミカル・サイエンティ・ジャパン, 62, 791-796 (1989))。この時

特開平3-292301 (2)

用いる多糖類-コレステロール誘導体の合成方法としては、特開昭61-69801号に示されるように、多糖類とモノクロロ酢酸との反応によるカルボキシメチル化多糖類の合成(ステップ1)、カルボキシメチル化多糖とエチレンジアミンとの反応によるN-(2-アミノエチル)カルバモイルメチル化多糖の合成(ステップ2)、N-(2-アミノエチル)カルバモイル化多糖とコレステリルクロロホルムエイトとの反応によるN-(2-(コレステリルオキシカルボニルアミノ)エチル)カルバモイルメチル化多糖の合成(ステップ3)の3つのステップからなる方法がこれまで採用されてきた。

(発明が解決しようとする課題)

特開昭61-69801号において開示されている方法においては、ステップ2においてカルボキシ基が未反応のまま最後まで残り易く、多糖被覆した際のリボソームあるいはエマルションの物理化学的安定性及び細胞特異性、適合性において、カルボキシ基の負荷電の影響を防止しえないという問題

が残っている。また、合成における行程数が長いという問題も残されている。

そこで、本発明者らは、予め、多糖類にカルボキシ基などの官能基を導入することなく、ステリル基を導入することを案出し、観察研究した結果、アルカンの一部の α -位にステリル基を持ち、他端の ω -位にイソシアナト基を持つ化合物と多糖類とを直接反応させることにより、多糖類にステリル基を一段階で簡便に導入できることを見出し、本発明に至った。

本発明は、多糖類にステリル基を導入する際、(1)多糖類にステリル基以外の官能基が共存しないこと、(2)ステリル基の導入量を比較的容易に制御できること、および(3)反応過程が短く且つ簡便であることを目的としており、これにより多糖類-ステロール誘導体の新規製造方法を提供するものである。

(課題を解決するための手段)

本発明は、多糖類にステリル基を導入するのに際し、アルカン類の一端 α -位にステリル基と他

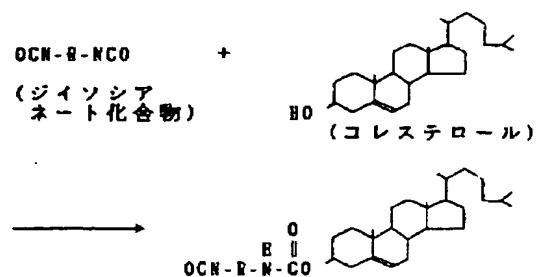
端 ω -位にイソシアナト基とを持つ化合物とを直接多糖類と反応させることを特徴とする多糖類-ステロール誘導体の製造方法である。

本発明に使用する多糖類は天然または合成由来の多糖類を用いることができ、例えばブルラン、アミロベクチン、アミロース、デキストラン、ヒドロキシエチルデキストラン、マンナン、レパン、イヌリン、キチン、キトサン、キシログルカン等が挙げられる。

本発明に使用するステロール類としては、例えばコレステロール、スチグマステロール、 β -シトステロール、ラノステロール、エルゴステロール等が挙げられる。

本発明に使用するアルカン類の一端 α -位にステリル基と他端 ω -位にイソシアナト基を有する化合物は、例えば下記の反応式に示されのように、ステロールとジイソシアナート化合物との反応により得られたものであり、ジイソシアナート化合物の一端のイソシアナト基は、ステロールの水酸基と反応し、ウレタン結合にてステロールと結合し、

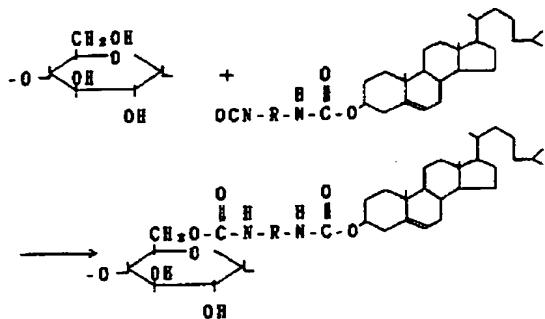
残りの一端のイソシアナト基は未反応のまま存在しているものである。



ジイソシアナート化合物はOCN-R-NCOで表すことができる化合物であり、例えばRがエチレン基であるエチレンジイソシアネート、ブチレン基であるブチレンジイソシアネート、ヘキサメチレン基であるヘキサメチレンジイソシアネート、ジフェニルメタン基であるジフェニルメタンジイソシアネートなどが挙げられるが、目的生成物である多糖類-ステロール誘導体の基本的利用法としてのリボソームまたは油滴の被覆のためには、望ましくは、ブチレンジイソシアネート、ヘキサメチ

レンジイソシアネートが過している。

本発明の製造方法は六炭糖を例として、下記の反応式に示されるように、多糖類を構成する单糖の水酸基と、分子の一端にステリル基と他端にイソシアナト基と有する化合物中のイソシアナト基との1ステップの付加反応である。



(多糖類-コレステロール誘導体)

反応時の溶媒は、多糖類および分子の一端にステリル基と他端にイソシアナト基と有する化合物の両者が溶解し、しかも反応の生成物である多糖類ステロール誘導体が溶解する溶媒が望ましく、

例えば、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ホルムアミド、ジオキサン、テトラヒドロフランなどの非プロトン供与性極性溶媒として知られるものが挙げられる。

反応時の温度および時間は、用いる多糖類と溶媒に対応して、上式の反応の進行状態により設定されるが、0~200℃、1~48時間が望ましい。

多糖類と分子の一端にステリル基と他端にイソシアナト基を持つ化合物の仕込み比は、多糖に対するステリル基の導入量により設定されるが、多糖類の100单糖単位に対して、0.1~10モル当量の範囲が望ましい。

反応生成物の精製方法としては、再沈澱精製法、各種カラムクロマトグラフィーによる分離精製法および透析法が利用できる。また、乾燥法としては凍結乾燥法、または真空乾燥法が望ましい。

(発明の効果)

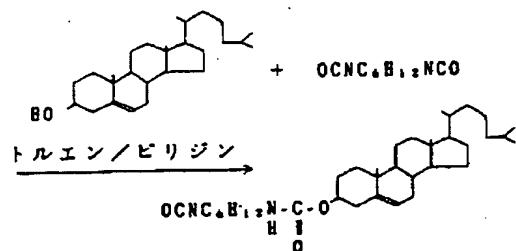
本発明によれば、多糖にステリル基を導入するために予め導入した過剰の官能基を残存することなく効率良く、ステリル基を多糖類に簡便にしか

も置換度を容易に制御して導入することができる。さらに反応工程を短縮することができ、多糖類-コレステロール誘導体の生産コストを引き下げる経済効果がある。

(実施例)

以下、合成例および実施例に基づき本発明を具体的に説明する。

(合成例) N-(6-イソシアナトヘキシル)コレステリカルバメイトの合成



トルエン(100mL)にコレステロール(3.86g、10mmol)を溶かし、これに、ピリジン(4mL)とヘキサメチレンジイソシアネート(23.9mL、148mmol)を加え、80℃で24時間反応させた。反応終

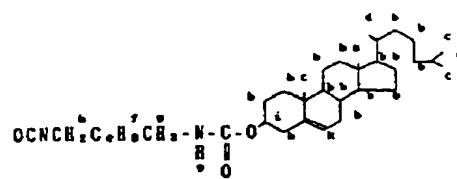
了後、トルエンおよび未反応のヘキサメチレンジイソシアネートを減圧除去した。これに石油エーテル(500mL)を加え、生成物を抽出させた。

2.44gの白色粉体を得た(収率45%)。

生成物のIRスペクトルおよび¹H-NMRスペクトルを第1図、第2図に示す。

IRスペクトルではN-H伸縮(3260cm⁻¹)、N-C=O伸縮(2320cm⁻¹)、C=O伸縮(1680cm⁻¹)、C-O-C伸縮(1130cm⁻¹)がそれぞれ確認される。

NMRスペクトルでは、N-(6-イソシアナトヘキシル)コレステリカルバメイトの各プロトンに対応するピークが帰属された(第1表)。



第1表

δ (ppm)	帰属	多重度	プロトン数	結合定数(Hz)
0.68	a	s	3	
0.70-2.40	b	-	28	-
0.85	c	d	6	9
0.92	d	d	3	7
1.02	e	s	3	
1.30-1.55	f	m	8	-
3.10	g	m	2	-
3.20	h	t	2	9
4.30-4.80	i,j	-	2	-
5.40	k	d	1	5

元素分析方法にて、生成分を分析した。結果を第2表に示す。

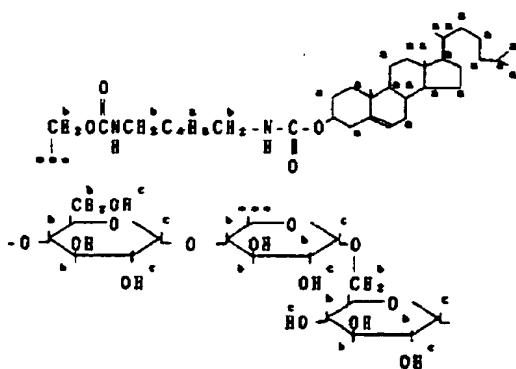
第2表

分析値(%)	計算値(%)
H 10.7	10.5
C 75.5	75.8
N 5.2	5.1

トルを示す。

第4図では、ウレタン結合 (-N-C-O-) に由来する $1180\text{~}900\text{ cm}^{-1}$ の吸収が認められる。

第5図に、生成物の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを示す。各プロトンの帰属は第3表に示され、コレステリル基がブルランに導入されたことが確認された。



計算値: N - (6-イソシアナトヘキシル) コレスチリルカルバメイトの理論計算値

以上、IR、NMR、元素分析法より生成物は、N - (6-イソシアナトヘキシル) コレスチリルカルバメイトであることが同定された。

(実施例1)

ブルラン (3.31 g、糖単位当たり 20mmol) を無水ジメチルスルホキシド (100 ml) に溶かし、ビリジン (8 ml) を加えた。これに、先に合成した N - (6-イソシアナトヘキシル) コレスチリルカルバメイト (0.552 g、1 mmol) を加え、100 °C で 8 時間反応させた。反応終了後、ジメチルスルホキシドを減圧除去し、これにエタノール (500 ml) を加えて生成物を析出させた。このものを識別採取し、エタノールを除去した。さらに、セルロースチューブ (VISKASE SALES 社製) を用いて透析により目的物を精製し、採取した。

収量 3.57 g (収率 85.4%)

第3図に原料のブルラン、第4図に生成物であるブルラン-コレステロール誘導体の IR スペク

第3表

δ (ppm)	帰属
0.60-1.70	a
3.00-4.00	b
4.30-5.70	c

生成物の元素分析値を第4表に示す。

第4表

生成物	ブルラン(原料)
H 6.76 %	6.67 %
C 43.72 %	40.55 %
N 0.63 %	0 %

ブルラン 100 単糖当たり x 個のコレステリル基が導入されているとすると、

$$\frac{N}{C} = \frac{(14.0 \times 2x)}{12.0 \times (6 + 35x)} = 0.63 / 43.72$$

$x = 4.7$ 個となり、ブルラン 100 単糖当たり、4.7 個のコレステリル基が導入されていることが分かる。

(実施例2)

実施例1と同じ反応操作により、ブルランとN-(6-イソシアナトヘキシル)コレステリルカルバメイトの仕込み比を変え、種々のブルラン-コレステロール誘導体を合成した。

結果を第5表に示す。

いずれの実験の生成物もIRスペクトルにはウレタン結合由来の1180~900 cm⁻¹に吸収が認められ、コレステリル基が導入されていることが確認される。

結果から明らかなように、反応時の原料比を変えることにより、コレステリル基の導入量の異なるブルラン-コレステロール誘導体を合成することができる。

実施例3

天然由来の多糖であるキシログルカン、アミロベクチン、マンナンを用い実施例1と同じ反応操作により多糖-コレステロール誘導体を合成した。コレステリル基の導入量を元素分析値より求めた。結果を第6表にまとめる。

ブルランと同様に他の多糖類でも容易にコレス

テリル基を導入できることがわかる。

実施例4

実施例2の実験2で合成したブルラン-コレステロール誘導体を用いて、エマルションを作成し、エマルション粒子の表面電位をゼータ電位測定装置(PEN TEN社、モデル501)にて測定した。

エマルションは油(グリセロールトリカブリン酸エステル、日本油脂製、10wt%)、ブルラン-コレステロール誘導体(5mg)、H₂O(1ml)をN₂気流下70℃で15分間超音波照射(20W)して作成した。結果を第7表にまとめる。

第5表

実験	仕込み(モル比) コレステリル基 ブルラン / 単糖	生成物(モル比)		生成物の収率 (仕込み比)
		コレステリル基 ブルラン / 単糖	コレステリル基 ブルラン / 單糖	
1	2.5 / 100	1.7 / 100	1.7 / 100	90.2 %
2	2.5 / 100	1.8 / 100	1.8 / 100	74.7 %
3	5.0 / 100	4.7 / 100	4.7 / 100	85.4 %
4	10.0 / 100	5.5 / 100	5.5 / 100	60.5 %

第6表

実験	多糖類	仕込み(モル比)		反応物の収率 (仕込み比)
		コレステリル基 ブルラン / 单糖	コレステリル基 ブルラン / 單糖	
1	キシログルカン	2.3 / 100	1.2 / 100	80.0 %
2	アミロベクチン	2.3 / 100	1.5 / 100	60.0 %
3	マンナン	3.7 / 100	1.9 / 100	70.0 %

第7表

ミーボテンシャル(mV)	
本発明の合成方法による	
誘導体を用いた時	-8.4 ± 1.9
従来法の合成方法による	
誘導体(特開昭61-69801)を用いた時	-55.1 ± 3.5

従来法では、ブルランに-COOH基が残存し易く、このためエマルションの表面が負に荷電していると考えられる。

本発明の合成方法によると、ブルランに-COOH基が導入されることはない。したがって第7表に示すミーボテンシャルの小さなエマルション粒子を作成することができ、このものは、例えば薬物運搬体として利用しようとするときの生体、細胞適合性の改善が期待できる。

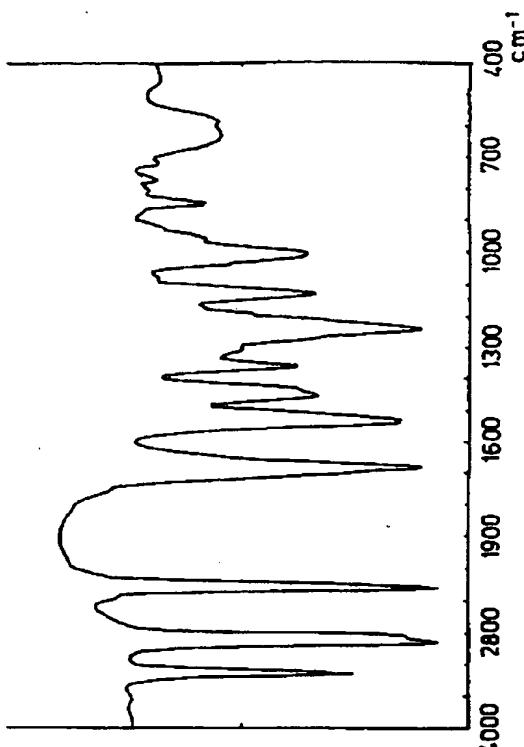
4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明の合成例で得られたN-(6-イソシアナトヘキシル)コレステリルカルバメイトのIRスペクトル、第2図は、同じく'H-

特開平3-292301(6)

NMRスペクトルである。第3図は実施例1の原料のブルラン、第4図は生成物であるブルラン-コレステロール誘導体のIRスペクトルであり、第5図はブルラン-コレステロール誘導体の¹H-NMRスペクトルである。第6図はキシログルカン-コレステロール誘導体のIRスペクトルであり、第7図はアミロベクチン-コレステロール誘導体のIRスペクトルであり、第8図はマンナン-コレステロール誘導体のIRスペクトルである。

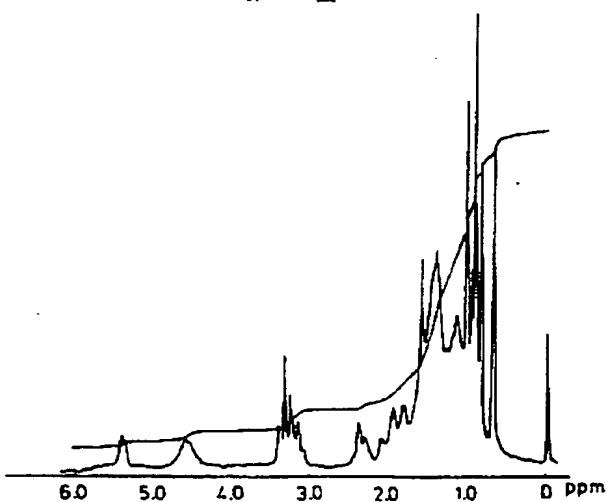
第1図



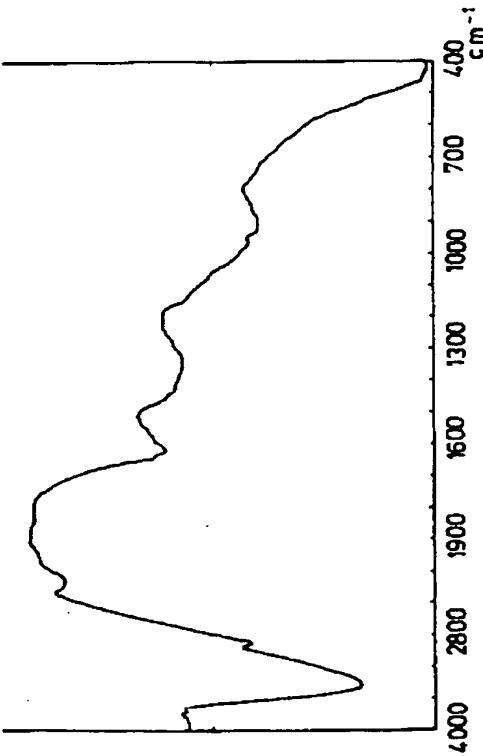
特許出願人 日本油脂株式会社
砂本順三
代理人 井理士舟橋英子



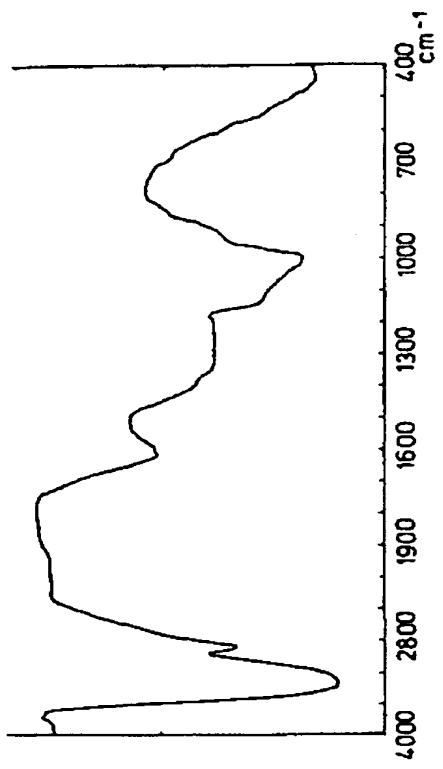
第2図



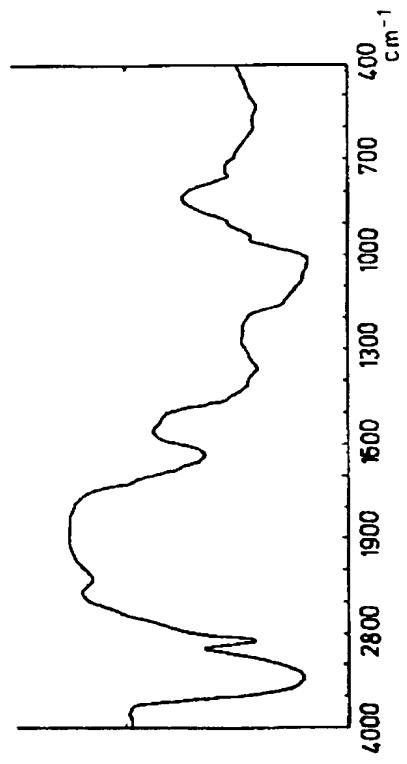
第3図



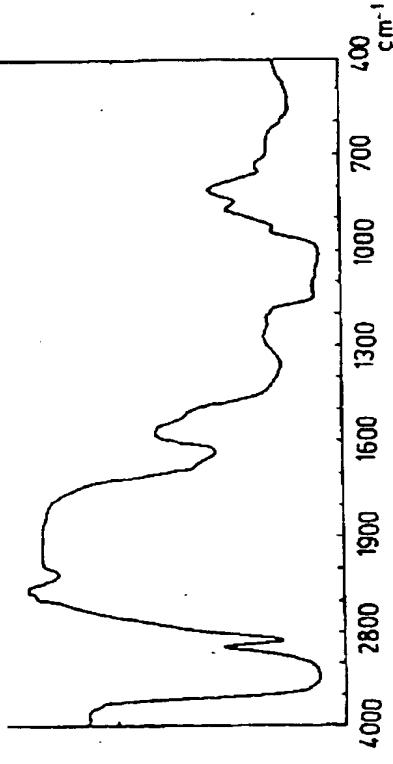
第4図



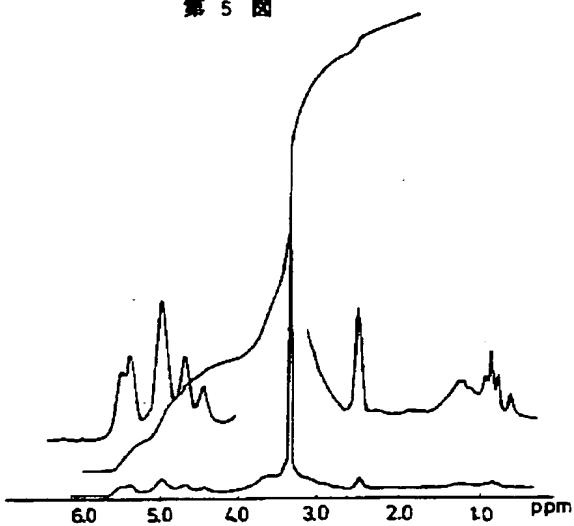
第6図



第7図



第5図



第 8 図

